

ВЛИЯНИЕ X-ЛУЧЕЙ И ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ПРОЦЕСС КРОССИНГОВЕРА

И. А. Захаров, С. Г. Инге-Вечтомов

МЕХАНИЗМ КРОССИНГОВЕРА И ИНДУЦИРОВАННАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ

Кроссинговер можно считать одним из важнейших генетических явлений. Он свойствен, по-видимому, всем живым существам — от вирусов до млекопитающих. Кроссинговер является одним из механизмов, обеспечивающих комбинативную изменчивость, и благодаря этому имеет большое эволюционное значение. При изучении кроссинговера были получены основные данные для познания дискретной структуры хромосом. Несмотря на столь исключительное значение кроссинговера, механизм этого процесса остается в значительной мере невыясненным. Сейчас накапливаются данные, свидетельствующие в пользу того, что внутрихромосомная рекомбинация тесно связана с репродукцией хромосом. Это должно еще более усилить интерес к кроссинговеру, так как кажется весьма вероятным, что изучение его механизма может явиться одним из многообещающих подходов к выяснению путей репродукции хромосом, являющейся кардинальной проблемой современной биологии. Механизм кроссинговера вызывает к себе интерес и с другой точки зрения. Его раскрытие важно для установления соотношений процессов мутирования и внутрихромосомных рекомбинаций, что необходимо для правильного понимания мутационного процесса.

Кроссинговер выявляется как перекомбинация сцепленных наследственных факторов. Как было показано Штерном (Stern, 1931) и рядом других авторов, при этом происходит материальный обмен участками гомологичных хромосом. Особенностью кроссинговера является та высокая точность, с которой он совершается. Обмениваемые участки в подавляющем большинстве случаев оказываются строго одинаковыми по размеру, т. е. обмен совершается между идентичными точками гомологичных хромосом.

Среди гипотез, выдвинутых для объяснения механизма таких обменов, в настоящее время заслуживают внимания три.

Исторически первым возникло представление о кроссинговере как о разрыве гомологичных хромосом с последующим рекомбинантным воссоединением. Оно было выдвинуто в школе Моргана, но цитологическая модель была наиболее детально разработана Дарлингтоном (Darlington, 1937). Согласно его гипотезе кроссинговер происходит на той стадии мейоза, когда конъюгирующие, перевитые друг с другом хромосомы редулицированы и образовалась тетрада из четырех хроматид. Эти четыре хроматиды находятся под воздействием нескольких сил. Это, во-первых, силы продольного натяжения в каждой хроматиде,

возникающие в результате скручивания хромосом; во-вторых, взаимно уравнивающиеся силы скручивания сестринских хроматид одной хромосомы друг с другом и силы скручивания (в противоположном направлении, чем предыдущее) расщепленного хромосом. При разрыве под воздействием силы продольного натяжения одной из хроматид динамическое равновесие в тетраде нарушается. Хроматиды гомологичной хромосомы начинают испытывать избыточное натяжение, причем в месте, точно соответствующем месту первого разрыва. Одна из этих хроматид разрывается в точке, гомологичной точке первого разрыва, произошедшего в другой хромосоме. Освободившиеся разорванные концы начинают раскручиваться, при этом концы первой разорвавшейся хроматиды встречаются с концами второй, в результате чего происходит рекомбинантное воссоединение.

Согласно другим гипотезам кроссинговер не связан с хромосомными разрывами; такой «безразрывный» кроссинговер, очевидно, может происходить лишь в момент формирования целостной структуры хромосомы. Среди таких гипотез наиболее ранней была гипотеза Беллинга (Belling, 1933). Основываясь на своих цитологических наблюдениях, Беллинг считал, что при воспроизведении хромосом, состоящих из цепочки хромомеров, в начале воспроизводятся отдельные хромомеры и лишь потом они объединяются продольными связями. До появления продольных связей хромомеры остаются некоторое время свободными и удерживаются в линейном порядке притяжением к гомологичным хромомерам старой хроматиды, связи в которой сохраняются. Новые, формирующиеся продольные связи могут соединить в новую хроматиду хромомеры, происходящие от разных хромосом, находящихся в это время в состоянии конъюгации. Новые хроматиды, таким образом, могут оказаться рекомбинантными.

Эта гипотеза, известная под названием гипотезы выбора конии (sore choice), была несколько видоизменена Ледербергом (Lederberg, 1955). Ледерберг предположил, что рекомбинация может происходить не при объединении редуплицированного материала, а в процессе самой редупликации. При этом вновь формирующаяся хроматида, начав воспроизводиться по матрице одной гомологичной хромосомы, в какой-то точке переключается на другую матрицу, другую гомологичную хромосому. Это, естественно, влечет переключение и второй формирующейся хроматиды, что будет приводить к реципрокной рекомбинации.

Близкая по своей сути гипотеза была предложена Холденом (Haldane, 1954), исходившим из своих представлений о механизмах биологического воспроизведения специфических макромолекулярных структур. По мнению Холдена, наиболее вероятно, что структура, например молекула ДНК, является матрицей для синтеза копии, состоящей из другого материала, например белка.

Исходная матрица затем прекращает свое существование, а по белковому «негативу» строятся два новых «позитива» из ДНК. Таким образом, в ходе каждого клеточного деления предсуществующая хромосома исчезает, а появляющиеся в результате процесса воспроизведения две хромосомы оказываются обе новыми. При своем воспроизведении отдельные элементы нуклеиновой цепочки оказываются еще не связанными в цельную структуру и удерживаются лишь своими белковыми шаблонами. При формировании новых хроматид может происходить перемешивание материала, берущего свое начало от двух гомологичных хромосом, и образуются рекомбинантные хроматиды.

При отсутствии прямых подходов к изучению механизма кроссинговера плодотворным путем может быть исследование действия внеш-

них факторов на этот процесс. Влияние внешних агентов на кроссинговер оценивается по изменению процента рекомбинации сцепленных факторов в потомстве гетерозиготной по этим факторам особи, подвергшейся воздействию.

Впервые (Plough, 1917, 1921; Stern, 1926) изменение частоты рекомбинации под влиянием внешних воздействий было показано на примере действия температуры — процент кроссинговера увеличивался под воздействием как низкой ($10-13^{\circ}$), так и высокой температуры ($30-32^{\circ}$). Затем было обнаружено индуцирующее влияние ионизирующих излучений (Mavog a. Svenson, 1923; Plough, 1924). В упомянутых работах воздействию подвергались самки дрозофилы, у которых в норме происходит кроссинговер; индуцирующий фактор лишь усиливал естественно идущий процесс. Фризену (1934), однако, удалось показать, что ионизирующие излучения и высокая температура индуцируют кроссинговер и у самцов дрозофилы, у которых в норме этот процесс подавлен.

Итоги первых работ по изучению влияния внешних факторов на кроссинговер были подведены Киккава (Kikkawa, 1934). Основные закономерности, установленные Киккава на основании опытов других авторов и собственных экспериментов, заключаются в следующем:

1. При действии внешних агентов изменения процента кроссинговера наблюдаются лишь в участках хромосомы, непосредственно прилежащих к центромеру, и в наиболее удаленном от него районе. При этом в центромерных участках индуцируется увеличение процента рекомбинации, а в дистальных концах хромосом процент рекомбинации снижается по сравнению с нормой.

2. Если от самки, подвергавшейся индуцирующему воздействию, извлекать последовательные кладки яиц и определять процент кроссинговера в этих кладках, то последствие любого фактора выявляется в форме волнообразной кривой — повышение процента рекомбинации сменяется в последующих кладках его снижением до уровня контроля и ниже.

Эти закономерности наблюдались как при действии лучевого, так и температурного факторов. На этом основании Киккава постулировал одинаковый механизм действия внешних факторов на кроссинговер. Это заключение Киккава переходит затем и в последующие обзоры, вплоть до настоящего времени (Whittinghill, 1954; Yost a. Benneyan, 1957).

Если авторы первых исследований по индуцированному кроссинговеру ставили своей задачей выяснение закономерностей действия внешних агентов на кроссинговер, то за последние годы появился ряд работ, в которых изучение индуцированного кроссинговера направлено на выяснение механизмов этого процесса. Так, было изучено влияние инфракрасных лучей в комбинации с x - и γ -лучами (Yost a. Benneyan, 1957), влияние ионизирующих излучений с различной интенсивностью (Herskowitz a. Abrahamson, 1957), эффект дегидратации (Ives et al., 1953; Herskowitz, 1959), а также ионов кальция и магния и комплексообразователя ЭДТА (Levine, 1955; Eversole a. Tatum, 1956).

Хотя уже накоплен значительный и интересный материал, он в ряде случаев оказывается противоречивым и не позволяет сделать окончательных выводов. Без ответа, в частности, остался и основной вопрос: связан ли индуцированный кроссинговер с хромосомными разрывами.

Авторами настоящей работы по предложению проф. М. Е. Лобашева было проведено сравнительное изучение двух индуцирующих факторов — лучевого и температурного. Эти агенты были выбраны

в силу их совершенно различного цитофизиологического характера действия.

Сопоставление этих агентов тем более необходимо, что повышенная температура, в отличие от рентгеновых лучей, не относится к числу факторов, вызывающих хромосомные разрывы. Для того чтобы облегчить сравнение влияния температуры и ионизирующего излучения, мы изменили методику температурного воздействия. Вместо обычно применяемого в опытах по индуцированному кроссинговеру длительного, но сравнительно слабого температурного воздействия (32° в течение нескольких суток) в настоящей работе было применено относительно кратковременное (шоковое) температурное воздействие (37° в течение 4 ч). Это давало большую сравнимость результатов действия температуры с эффектом х-лучей, так как облучение всегда проводится в течение короткого промежутка времени.

Задачей данной работы было, во-первых, сравнить влияние на процесс кроссинговера лучевого и температурного воздействий, обратив особое внимание на чувствительные стадии к действию этих факторов и, во-вторых, изучить действие х-лучей и высокой температуры при их последовательном применении. Последняя задача вытекала из предположения, что ионизирующие излучения, кроме непосредственного эффекта прямого увеличения частоты кроссинговера, могут вызывать какие-то хромосомные изменения, которые реализуются лишь при дополнительном воздействии высокой температурой.¹

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования была использована *Drosophila melanogaster*.

Перестроивалась частота рекомбинации рецессивных факторов *ss* и *st* в центромерном участке III хромосомы: *ss* в гомозиготе вызывает редукцию макрорет, *st* — ярко-красный цвет глаз. Факторы локализованы: *ss* в левом плече хромосомы на 58,5 морганид, *st* в правом плече на 44,0 морганид, центромер на 46,5 морганид. Материалом служили линии *ss st e* и Кантон-С — дикий тип. В качестве индуцирующих агентов были взяты: рентгеновское излучение, кратковременное нагревание и комбинация этих воздействий.

Личинки в возрасте 4—5 дней, полученные от скрещивания самок *ss st e* с самцами дикого типа, извлекались из сосудов и помещались на вату. В эксперименте использовались только те личинки, которые успевали окуклиться в течение последующих шести часов, что давало материал с возрастной разницей ± 3 ч. Собранные куколки разбивались на 4 группы: *к* — контроль, не подвергавшийся действию индуцирующих агентов; *t* — группа, подвергавшаяся температурному воздействию; *х* — рентгенизации; *х + t* — рентгенизации с последующим температурным воздействием.

Индуцирующими агентами обрабатывались куколки в возрасте 70 ч с момента окукливания. Облучение производилось в лаборатории радиобиологии Петергофского биологического института ЛГУ с использованием аппарата РУМ-11.² Режим облучения: напряжение — 200 кВ, ток — 15 мА, расстояние от антикатада — 33 см. Облучение без фильтра, мощность дозы 223,5 р/мин, доза 1500 р. Точность измерения дозы $\pm 10\%$ по паспорту рентгенометра КД-1.

¹ См. статью К. В. Ватти в настоящем сборнике.

² Авторы выражают признательность С. Е. Захаровой, осуществлявшей облучение и дозиметрию.

Через 3—5 мин после облучения материала в вариантах x и $x+t$, куколки вариантов t и $x+t$ помещались в термостат на 4 ч при температуре 37°. Как до, так и после воздействий материал содержался при температуре 25°.

После вылупления самки, гетерозиготные по факторам $ss\ st$ во всех четырех группах, сразу же скрещивались с гомозиготными самцами $ss\ st$. Через каждые 1—3 дня родители перебрасывались на свежую среду для получения последовательных кладок.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из пяти повторностей опыта, проведенных по описанной выше схеме, четыре выявили одинаковую закономерность действия индуцирующих агентов. В пятой повторности в вариантах t и $x+t$ действия температуры не наблюдалось, очевидно в связи с неучтенными изменениями в условиях эксперимента.

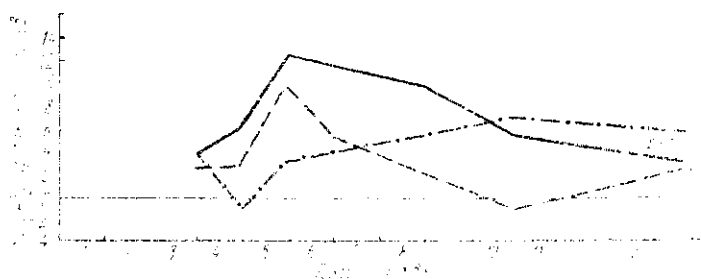


Рис. 1. Изменение процента рекомбинации под влиянием факторов x , высокой температуры (t) и последовательного воздействия этих факторов ($x+t$).

В табл. 1 приводятся результаты одной из повторностей опыта. В них указывается как наблюдавшийся в опытах процент рекомбинации, так и исправленный процент, вычисленный с учетом возможности прохождения двойных обменов на участке $ss-st$. Соответствующая поправка рассчитана на основании графиков Бриджеса (по Медведеву, 1935); при этом предполагалось, что во всех вариантах опыта интерференция остается одинаковой.

При рассмотрении результатов опытов нетрудно заметить ряд особенностей в действии индуцирующих агентов: контроль колеблется около некоторой средней величины, в то время как температурное воздействие вызывает во второй-третьей кладках резкое повышение процента рекомбинации, которое вскоре исчезает. В вариантах с рентгенизацией повышение процента рекомбинации происходит постепенно и долго сохраняется примерно на одном уровне.

Самки, подвергшиеся комбинированному воздействию индуцирующих агентов — $x+t$, в первых кладках показывают превышение процента рекомбинации, как по отношению к t , так и к x , а затем уравниваются с вариантом, где проводилось лишь одно облучение. В условиях нашего эксперимента эффект воздействия $x+t$ был примерно равен арифметической сумме эффектов x и t порознь. Наиболее четко эти закономерности выявляются при детальном рассмотрении полученных результатов, что будет сделано ниже. Описанная картина изменения процента рекомбинации под влиянием облучения и высокой температуры может быть проиллюстрирована графически (рис. 1).

Основной вывод из результатов опытов заключается в том, что температура, повышающая процент рекомбинации лишь в течение сравнительно короткого промежутка времени, является агентом, специфически действующим на определенную стадию оогенеза. В отличие от этого x -лучи вызывают изменение процента рекомбинации в ряде последовательных кладок, в течение по меньшей мере 10 дней. Если считать, что каждая кладка соответствует определенной стадии зачатковых клеток в момент индуцирующего воздействия, то облучение в отношении индуцированного кроссинговера может считаться агентом, не специфическим для какой-либо стадии оогенеза.

Таблица 1

Влияние x -лучей и высокой температуры на частоту рекомбинации факторов $ss\ st$

№ кладки	Дни	Варианты	Число мух	%, рекомбинации	Достоверность различия t		Исправленный % рекомбинации
					$s\ k$	$s\ x$	
I	1-3	k	663	$12,8 \pm 1,29$	—	—	13,8
		t	1590	$15,2 \pm 0,90$	1,29	—	16,5
		x	824	$16,7 \pm 1,30$	1,87	—	18,2
		$x+t$	525	$16,7 \pm 1,62$	1,70	0	18,2
II	4	k	703	$10,3 \pm 1,14$	—	—	11,1
		t	1376	$13,0 \pm 0,92$	1,84	—	14,1
		x	812	$9,9 \pm 1,04$	0,25	—	10,6
		$x+t$	622	$16,5 \pm 1,10$	3,99	4,36	18,0
III	5	k	565	$10,0 \pm 1,26$	—	—	10,8
		t	1331	$19,8 \pm 1,08$	5,91	—	21,7
		x	799	$13,6 \pm 1,21$	2,06	—	14,7
		$x+t$	670	$22,5 \pm 1,61$	6,12	3,75	24,8
IV	6-8	k	1580	$15,8 \pm 0,91$	—	—	17,2
	6	t	1648	$21,5 \pm 1,00$	4,22	—	23,6
	7-8	x	1416	$17,4 \pm 1,00$	1,19	—	19,0
	6-8	$x+t$	2166	$21,7 \pm 0,89$	4,63	—	22,8
V	9-10	k	1198	$12,1 \pm 0,93$	—	—	13,1
		t	2185	$11,7 \pm 0,68$	0,34	—	12,6
		x	1367	$18,9 \pm 1,05$	4,85	—	20,6
		$x+t$	1390	$17,5 \pm 1,01$	3,94	0,96	19,1
VI	11-14	k	1009	$11,1 \pm 0,98$	—	—	12,0
		t	2391	$13,7 \pm 0,70$	2,16	—	14,8
		x	1653	$17,1 \pm 0,94$	4,14	—	18,7
		$x+t$	1538	$14,2 \pm 0,88$	2,36	2,42	15,4

Данные, приведенные в табл. 1, являются суммарными по потомству нескольких самок, контрольных и подвергшихся воздействию. Немедленно встает вопрос об однородности того материала, на котором основывается сделанный выше вывод. Действительно, растянутый во времени эффект облучения мог наблюдаться как в том случае, если x -лучи индуцируют обмены при действии на оогонии различных стадий, так и в том случае, если различные облученные самки будут обна-

руживать повышение частоты рекомбинации в разных кладках, например одна в четвертой, другая в пятой и т. д. При суммации эти индивидуальные различия будут нивелироваться, а результат будет выражаться кривой, подобной той, которая представлена на графике рис. 1 (вариант х).

В этом случае, очевидно, необходимо рассмотрение материала по семьям. В табл. 2, 3, 4 приведены соответствующие данные по вариантам k , t и x , а на рис. 2 графически представлены выборочные материалы по разным вариантам опыта.

Рассмотрение их начнем с контрольной группы.

Как видно по результатам, приведенным в табл. 1, суммарные проценты кроссинговера в контроле колеблются около какой-то средней величины. Рядом авторов (Plough, 1917; Bridges, 1927) было обнаружено изменение процента рекомбинации в зависимости от возраста матери. Описывается снижение частоты кроссинговера по кладкам в течение первых десяти дней с последующим повышением. Как показывают результаты настоящей работы, в течение интервала первых десяти дней также наблюдаются волнообразные изменения частоты рекомбинаций. То, что эти колебания имеют реальную, а не статистическую природу, показывает рассмотрение изменений процента рекомбинации в отдельных семьях (табл. 2, рис. 2а).

Таблица 2

Частота рекомбинации в потомстве контрольных самок

№ самка	Дни кладки						Всего потом- ства
	1—3	4	5	6—8	9—10	11—14	
1	13,7	10,2	19,6	9,9	15,0	12,5	527
2*	10,8	9,4	1,4	15,6	8,6	7,9	705
3*	4,8	12,6	9,3	15,1	14,0	10,2	700
4	18,1	14,2	12,3	15,3	11,8	14,5	711
5	11,5	7,0	15,3	21,0	16,0	10,0	563
6*	10,1	8,7	11,9	15,7	10,8	6,4	626
7*	14,8	10,3	5,8	15,5	11,0	6,8	620
8*	24,1	13,6	3,6	18,4	12,2	12,6	594
9	9,5	7,1	12,9	16,1	10,1	17,0	671

Примечание. Звездочкой отмечены семьи, изменение процента рекомбинации которых графически представлено на рис. 2, а.

В разных семьях возрастные колебания кроссинговера имеют однотипный характер, что и дает возможность суммировать данные, полученные по отдельным семьям. Рассматривать подобным образом материал возможно лишь когда от самок получаются достаточно большие кладки; если кладки получаются однодневные, то в связи с малым числом потомства от одной самки на закономерные, связанные с возрастом колебания процента рекомбинации накладываются чисто статистические. Поэтому при посемейственном анализе сроки кладок не могут составлять менее 2—3 дней.

Кривые изменения частоты рекомбинации в потомстве самок, подвергшихся индуцирующему воздействию, заметно отличаются от контроля. Все числовые данные приведены в табл. 3 и 4, а выборочные примеры — на рис. 2б и 2в.

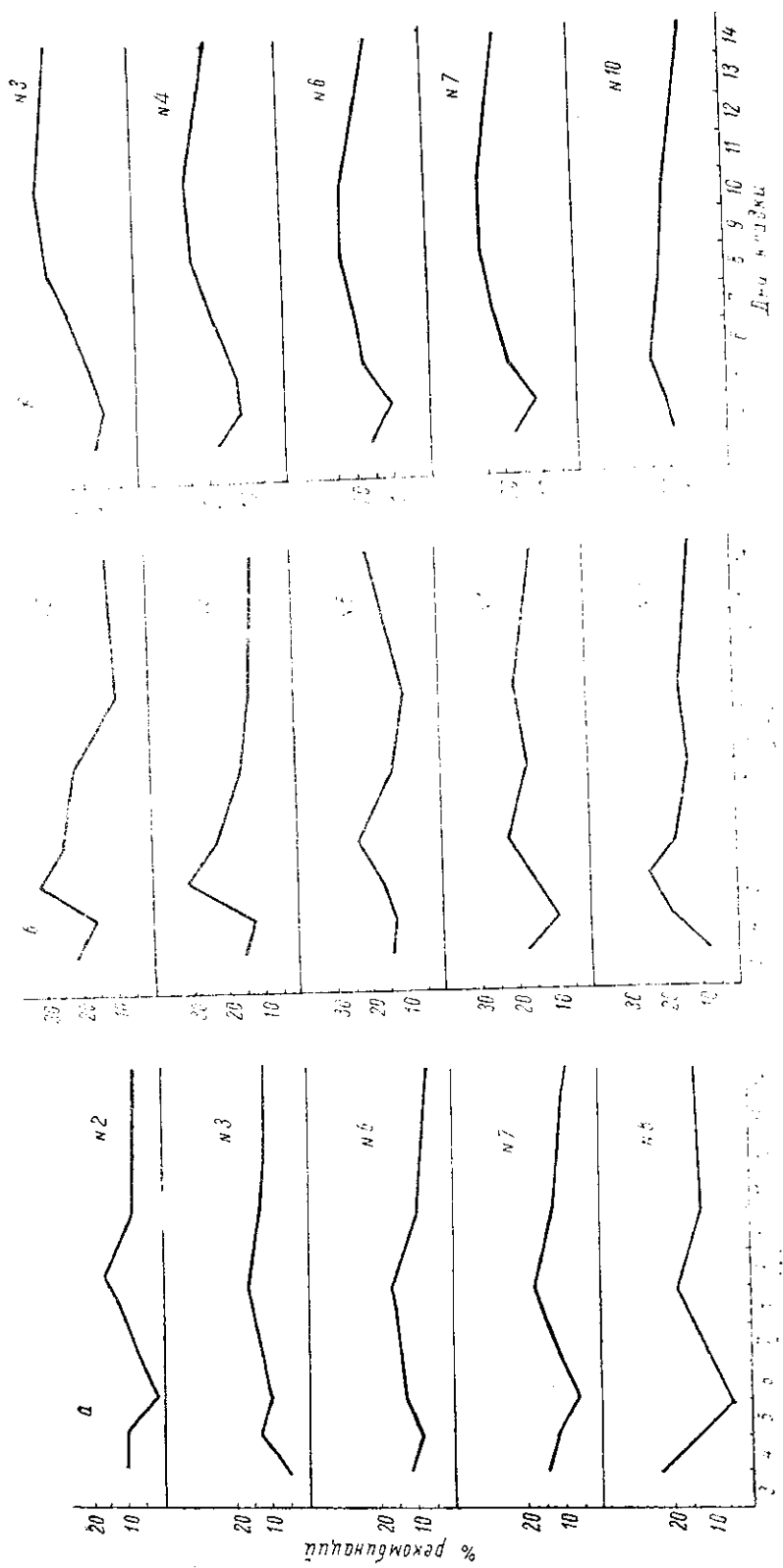


Рис. 2. Поведение при нагревании образцов, полученных из смеси, содержащейся в образце, при нагревании.

Таблица 3

Частота рекомбинаций в потомстве подвергшихся действию температуры самок

№ самок	Дни кладки							Всего потомства
	1—3	4	5	6	7—8	9—10	11—14	
1	7,6	20,3	16,6	24,7	20,8	11,2	17,4	696
2*	19,1	14,1	30,8	24,6	20,5	8,7	11,4	733
3*	13,2	12,3	30,6	22,2	15,0	13,5	11,1	614
4	12,5	17,3	12,5	15,3	26,8	12,5	14,0	640
5	19,1	12,7	22,0	26,5	11,9	10,2	13,9	762
6*	12,7	12,7	16,1	28,7	12,7	9,2	18,1	637
7	14,8	—	4,2	28,5	19,7	9,6	6,5	573
8	8,4	7,5	22,7	22,8	13,7	11,3	14,4	669
9	11,6	—	20,3	21,9	—	—	—	272
10	15,4	12,3	4,5	14,6	15,2	9,6	9,8	529
11	16,6	18,1	30,0	25,8	23,2	8,2	21,1	679
12*	17,0	8,6	30,9	22,0	16,5	17,7	13,5	739
13*	7,3	16,0	23,2	16,2	13,6	14,7	11,8	693
14	19,4	14,8	9,0	17,5	—	—	—	239
15	21,8	17,2	16,9	18,0	15,5	18,1	19,7	619
16	—	—	—	—	—	—	—	—
17	11,7	11,9	15,5	21,9	—	9,1	9,7	538
18	20,8	14,2	23,0	16,4	—	—	—	230
19	17,1	13,5	14,8	25,6	15,7	10,3	7,3	572
20	21,6	16,9	22,5	21,2	38,4	8,6	13,6	569
21	21,1	16,6	19,6	15,9	—	—	—	303
22	12,9	7,4	13,5	20,6	19,2	18,8	13,7	636

Примечание. Звездочкой отмечены семьи, изменение процента рекомбинаций которых графически представлено на рис. 2б.

Таблица 4

Частота рекомбинации в потомстве облученных самок

№ самок	Дни кладки						Всего потомства
	1—3	4	5	6—8	9—10	11—14	
1	19,3	6,0	13,1	21,2	11,6	19,2	661
2	18,9	7,6	7,8	25,3	—	17,6	517
3*	10,7	8,3	11,2	23,0	25,2	21,6	644
4*	18,6	11,6	12,1	23,4	24,0	17,8	766
5	18,3	8,9	14,0	23,6	—	—	392
6*	15,1	10,9	16,4	21,6	22,0	14,2	628
7*	16,6	12,1	17,4	24,1	24,4	18,1	635
8	14,2	6,3	19,2	25,8	26,4	20,6	440
9	19,4	12,5	14,2	24,4	13,0	15,9	636
10*	13,5	15,7	19,6	15,3	14,8	8,2	643
11	11,1	9,6	11,8	12,6	8,5	14,1	596
12	32,1	8,3	14,0	19,2	22,5	16,8	461
13	15,2	8,4	10,1	22,4	17,1	20,1	660

Примечание. Звездочкой отмечены семьи, изменение процента рекомбинации которых графически представлено на рис. 2в.

Самки температурного варианта обнаруживают резкий пик на 5—7 день, с последующим более или менее резким снижением частоты рекомбинации. После облучения характер кривых отличается от таковых, как в контроле, так и в варианте с температурным воздействием.

Примерно с пятого дня кладки начинается плавный подъем процента кроссинговера. Повышенная частота рекомбинации затем сохраняется, примерно, на одном уровне по меньшей мере до 14-го дня.

Однотипность реакции отдельных самок свидетельствует, что закономерности действия температуры и облучения на кроссинговер, выявленные при рассмотрении суммарных данных табл. 1, реальны, а не являются артефактом, связанным со способом обработки материала.

Последний момент, на который следует обратить внимание, — это размах изменчивости процента рекомбинации по семьям. Хотя, как было показано выше, в вариантах с индуцированными воздействиями в отдельных семьях наблюдаются сходные изменения частоты рекомбинации в последовательных кладках, величина процента рекомбинации в тех кладках, где наблюдался максимальный эффект, частота кроссинговера, оказывается различной. Так, в температурном варианте величина пика индуцированного кроссинговера в различных семьях колеблется от 15,2 до 38,4%. По данным анализа этих отдельных серий можно отметить, что в семьях, где эффект индуцированного кроссинговера был более выражен, эффект температурного воздействия был менее выражен. При этом величина эффекта температурного воздействия в семьях с более выраженным эффектом индуцированного кроссинговера была в среднем меньше, чем в семьях с менее выраженным эффектом индуцированного кроссинговера. Таким образом, эффект температурного воздействия на частоту кроссинговера в семьях с более выраженным эффектом индуцированного кроссинговера был в среднем меньше, чем в семьях с менее выраженным эффектом индуцированного кроссинговера. При этом следует отметить, что величина эффекта температурного воздействия в семьях с более выраженным эффектом индуцированного кроссинговера была в среднем меньше, чем в семьях с менее выраженным эффектом индуцированного кроссинговера. Таким образом, эффект температурного воздействия на частоту кроссинговера в семьях с более выраженным эффектом индуцированного кроссинговера был в среднем меньше, чем в семьях с менее выраженным эффектом индуцированного кроссинговера.

ОБСУЖДЕНИЕ

Выводы, полученные в опытах, показывают, что температурное воздействие и выкладка температура, вопреки выкладке, влияющему на частоту выкладки, действуют на кроссинговер по-одиночке. При рассмотрении изменений частоты рекомбинации в последовательных кладках яиц с подвергавшихся воздействию самок эффект температуры выявляется лишь кратковременно, в кладках 4-6-го дня, в то время как для выкладки характерно растянутое во времени действие: увеличение процента кроссинговера наблюдается по меньшей мере до 14-го дня. Подобное растянутое действие облучения не раз отмечалось в литературе при индуцировании кроссинговера, как у самок (Whittinghill, 1954; Herskowitz a. Abrahamson, 1957), так и у самцов (Schacht, 1958). Различие в картине действия x-лучей и высокой температуры было отмечено еще Мейвором и Свенсоном (Mayor a. Svenson, 1923), но не принималось во внимание последующими авторами. Одной из причин этого, очевидно, является то, что в опытах с температурным воздействием применялось продолжительное содержание мух в высокой температуре (несколько суток); естественно поэтому, что увеличение частоты рекомбинации наблюдалось в нескольких последовательных кладках и внешне эффект температуры был сходен с эффектом рентгеновых лучей. Различие же этих факторов выявляется особенно резко при применении кратковременного температурного воздействия, что было сделано в настоящей работе.

У дрозофилы в зрелых яйцеклетках ядро находится на стадии метафазы I деления созревания. Следующие стадии мейоза проходят уже после оплодотворения. Зрелые яйцеклетки появляются примерно с середины стадии куколки (Demerec, 1950). Таким образом, в вышеописанных опытах примененные факторы действовали на ооциты в мета-

фазе I, ооциты в профазе I (когда происходит конъюгация хромосом) и на оогонии. Данные Плау (Plough, 1917) позволяют связать отдельные кладки с определенными стадиями в оогенезе. Плау в результате параллельного генетического и цитологического изучения показал, что высокая температура сказывается лишь на стадии ранних ооцитов сразу же после последнего оогонимального деления, когда хромосомы находятся на стадии поздней лептотены или ранней диплотены, т. е. при конъюгации хромосом, когда и происходит нормальный процесс кроссинговера.

Очевидно потому, что яйца тех кладок, где выявилось влияние температуры, происходят от оогониев, находившихся в момент воздействия на стадии профазы I деления созревания, первые кладки, на которых температура не сказалась, происходят от зрелых ооцитов, а последние кладки, где влияние температуры перестает наблюдаться — от зачатковых клеток, бывших на предмейотических стадиях в момент воздействия.

Важно подчеркнуть, что облучение индуцировало увеличение частоты рекомбинации как в кладке, соответствующей стадии ранних ооцитов, так и в кладках, соответствующих предмейотическим, оогонимальным стадиям. Наиболее вероятным представляется следующее объяснение этой особенности.

Кроссинговер представляет собой такое генетическое явление, которое в отличие от мутаций или хромосомных разрывов, может происходить лишь во время конъюгации хромосом и обмена. Однако облучение влияет на стадию, предшествующую конъюгации, как-то: вклинивание в хромосомы, реализующиеся при конъюгации как обмены. Цитологическая природа их не менее сложна, чем обмен или обмен хромосомными aberrациями, например, радиация, вызывая разрывы, с которыми обмен ооцит приводит лишь к отсутствию некоторой части после своего возникновения, при переходе клетки в соответствующую стадию мейотического деления.

Наблюдая индукцию кроссинговера при облучении зачатковых клеток на предшествующих мейоту стадиях у самцов дрозофилы, Шахт (1958) связывает это явление с индуцированием хромосомных разрывов. Транслокации, которые в своем возникновении тесно связаны с хромосомными разрывами, и индуцированные обмены оказываются в опытах Шахта взаимно исключяющимися явлениями, т. е. на тех стадиях, где возникают одни, отсутствуют другие. Это свидетельствует о том, что разрывы, возникшие до конъюгации, реализуются как обмены, возникшие после — как транслокации.

Возможно, что это явление имеет место и при индуцировании кроссинговера у самок. Юст и Бенейан (Yost a. Bennejan, 1957), однако, на основании опытов с комбинированным воздействием инфракрасными и ионизирующими излучениями, отрицают участие вызываемых радиацией хромосомных разрывов в индуцированном кроссинговере. Вопрос о цитологической и генетической природе индуцируемых излучением хромосомных изменений, реализующихся затем как обмены, таким образом, требует дальнейшего изучения.

Подводя итоги, можно сказать, что высокая температура, по-видимому, непосредственно влияет на процесс кроссинговера, что может достигаться в результате изменения физико-химических свойств хромосом, благодаря чему они более тесно конъюгируют, или же в результате большей легкости обменов благодаря временной нестабильности химических связей в хромосоме. В отличие от этого, увеличение частоты кроссинговера после облучения — результат того, что

излучения индуцируют какие-то изменения в хромосомах, которые лишь при конъюгации реализуются как обмены. Эти изменения более или менее длительно сохраняются в хромосомах, что приводит к выявлению растянутого во времени эффекта облучения.

При рассмотрении исследованного в настоящей работе последовательного действия x -лучей и высокой температуры видно, что последняя, примененная после действия x -лучей, вызывает превышение процента кроссинговера по сравнению с вариантом, где проводилось одно облучение, лишь в тех кладках, в которых обнаруживается действие и одной температуры. Очевидно, что если бы высокая температура влияла на сам эффект облучения, то разница вариантов $x+t$ и x наблюдалась бы во всех кладках. Это, однако, не имеет места. Отсюда можно заключить, что в условиях наших опытов исследованные факторы обнаруживали независимое действие на процесс кроссинговера.

ВЫВОДЫ

1. При сравнительном изучении влияния x -лучей (1500 ρ) и высокой температуры (37° в течение 4 ч) на частоту кроссинговера в участке *ss st III* хромосомы самок *Drosophila melanogaster* показано, что эффект исследованных агентов выявляется в различных кладках подвергшихся воздействию самок.

2. Влияние высокой температуры оказывается кратковременным и обнаруживается лишь в кладках, полученных на 4–6-й день после воздействия. В отличие от этого, эффект x -лучей длительно сохраняется, так как индуцированные им обмены выявляются в кладках с 4 по 14-й день.

3. Эти данные рассматриваются как свидетельство того, что высокая температура является фактором, специфичным лишь для одной стадии оогенеза, предположительно момента конъюгации хромосом, в то время как x -лучи индуцируют обмены в зародышевых клетках как в профазе I деления созревания, так и на предыдущих стадиях.

4. При последовательном применении x -лучей и высокой температуры последняя увеличивает эффект x -лучей лишь в той же кладке, в которой обнаруживается собственный температурный эффект, что говорит о независимом действии этих факторов.

EFFECT OF X-RAYS AND HIGH TEMPERATURE ON CROSSING OVER

I. A. Zakharov and S. G. Inge-Vechtomov

In the course of comparative studies of the effect of x -rays and of high temperature on the crossing over frequency in the centromere region of the III chromosome in the females of *D. melanogaster* these two factors have been observed to increase the cross-over value in different broods derived from the treated females. The effect of high temperature proved to be limited only to the broods of 4–6 days after treatment. On the contrary, x -rays have been observed to increase the cross-over value in many successive broods. This suggests that high temperature is a factor, the effect of which is specific for but one stage of oogenesis, presumably the moment of chromosome pairing, while x -rays induce crossing over being applied not only during the prophase of the first meiotic division, but also at the preceding stages of oogenesis. Some changes of chromosomes of oögonia, that result in chromosomal exchanges later, at the prophase of the first

meiotic division, might be supposed to be induced by x-rays. It is suggested by the results of the studies in the effect of the successive application of x-rays and high temperature that these two factors act independently.

ЛИТЕРАТУРА

- Медведев Н. П. 1935. Законы наследственности в опытах с дрозофилой. М.—Л., Изд. АН СССР.
- Фризен Г. 1934. Биол. ж., 3, 1: 112—121.
- Belling J. 1933. Genetics, 18, 4: 388—413.
- Bridges C. B. 1927. J. gener. physiol., 8, 6: 689—700.
- Darlington C. D. 1937. Recent advances in cytology. London.
- Demerec M. 1950. The biology of *Drosophila*. N. Y.
- Eversole R. A. and E. L. Tatum. 1956. Proc. Nat. Acad. sci., 42, 2: 68—73.
- Herskowitz J. H. 1959. Genetics, 44, 3: 329—339.
- Herskowitz J. H. and S. Abrahamson. 1957. Genetics, 42, 4: 444—453.
- Haldane G. B. S. 1954. The biochemistry of genetics. London.
- Ives P. T., B. J. Fenton, H. T. Yost and R. P. Levine. 1953. Proc. Nat. Acad. sci. 39, 11: 1131—1141.
- Kikkawa H. 1934. J. genetics, 28, 3: 329—348.
- Lederberg J. 1955. J. cell. comp. physiol., 45, suppl. 2: 75—107.
- Levine R. P. 1955. Proc. Nat. Acad. sci., 41, 10: 727—730.
- Mayer J. W. and H. K. Svenson. 1923. Science, 58, 1494: 124—126.
- Plough H. H. 1917. J. exper. zool., 24, 2: 147—209.
- Plough H. H. 1921. J. exper. zool., 32, 2: 187—202.
- Plough H. H. 1924. Amer. nat., 58, 654: 85—87.
- Schacht L. E. 1958. Genetics, 43, 5: 665—678.
- Stern C. 1926. Proc. Nat. Acad. sci., 12, 8: 530—532.
- Stern C. 1931. Biol. Zbl., 51, 10: 547—587.
- Whittinghill M. 1954. J. cell. comp. physiol., 45, suppl. 2: 189—220.
- Yost H. T. and R. N. Benneyan. 1957. Genetics, 42, 2: 147—160.